

Zeitschrift: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

Herausgeber: Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften

Band: 10 (1954)

Heft: 6

Artikel: Spektroskopische Untersuchungen über die Änderung des Aneurinmoleküls

Autor: Somogyi, J.C.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-307189>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 02.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern

Spektrophotometrische Untersuchungen über die Änderung des Aneurinmoleküls

Von J. C. Somogyi

Im Laufe unserer Versuche über die Antianeurinfaktoren (Somogyi, 1952 [1]) hat sich das Bedürfnis gezeigt, eine Methode zu besitzen, mit der sich die Änderung des Aneurinmoleküls verfolgen läßt, um so eventuell einen Einblick in den Abbaumechanismus von Vitamin B₁ unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu erhalten.

Um dieses Ziel zu erreichen, schien uns die Bestimmung der Ultraviolettabsorptionsspektren von Aneurin und seinen Spaltprodukten geeignet. Gleichzeitig sollte auch untersucht werden, ob sich die spektrophotometrische Methode zu einer quantitativen Aneurinbestimmung ausbauen ließe.

Wir haben daher das Aneurin auf verschiedene Weise abgebaut, so z. B. durch Einwirkung von Sulfiten, von Alkalien und durch einen gereinigten Karpfeneingeweideextrakt. Die aktuelle B₁-Konzentration wurde im Versuchsgemisch mit der Thiochrommethode bestimmt und gleichzeitig wurden die Änderungen der U.V.-Absorptionsspektren des Aneurins bzw. seiner Komponenten festgehalten.

Da das U.V.-Absorptionsspektrum von Aneurin pH-abhängig ist und andererseits die diesbezüglichen Literaturangaben einander teilweise widersprechen, haben wir vorerst ebenso diese pH-Abhängigkeit, wie auch die Frage der Reversibilität des B₁-Spektrums – ein Problem, das für unsere weiteren Versuche von Bedeutung war – einer neuen Prüfung unterzogen.

Methodisches

Die Konzentration des Aneurins im Versuchsgemisch wurde mit der Thiochrommethode von von Fellenberg, 1942 (2, 3), gemäß der Verbesserung von von Brasch, 1948, 1952 (4) durchgeführt. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren haben wir ein Beckman-Spektrophotometer, Mo-

¹ Über Forschungen, welche mit der Unterstützung der Schweiz. Akademie der Medizinischen Wissenschaften durchgeführt wurden.

dell DU benützt. Methodische Einzelheiten sowie die genaue Versuchsanordnung werden jeweils bei den einzelnen Versuchsreihen ausführlich besprochen.

Versuche

1. Das U.V.-Absorptionsspektrum von Aneurin bei verschiedenen pH und die Frage seiner Reversibilität.

Die U.V.-Absorptionsspektren von Aneurin und seinen Bausteinen wurden in den letzten 20 Jahren wiederholt untersucht. So haben Windaus und Mitarb., 1932 (5), Peters und Philpot, 1933 (6), Holiday, 1935 (7), Heyroth und Loofbourow, 1934, 1936 (8), Wintersteiner, Williams und Ruehle, 1935 (9), Melnick, 1939 (10), Ferrari, 1942 (11), Stämpfli, 1942 (12), Holiday, Irwin und Mitarb., 1946 (13), Lenormant und de Lozé, 1951 (14) das U.V.-Spektrum von Vitamin B₁ bestimmt. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Absorptionskurve von Aneurin pH-abhängig ist. Die erhaltenen Versuchsergebnisse der verschiedenen Autoren stehen oft in Widerspruch zueinander, was teilweise durch andersartige Versuchsbedingungen, z. B. die Divergenz der verwendeten Lösungsmittel (H₂O, Phosphatpuffer, Alkohol) zu erklären ist. Andererseits sehen wir bei Durchsicht der oben erwähnten Arbeiten², daß das U.V.-Spektrum von Aneurin bei bestimmtem pH entweder noch nicht aufgenommen wurde oder aber unter so verschiedenen Versuchsbedingungen, daß ein Vergleich schwer ist. Wir haben daher schon im Hinblick auf unsere weiteren Versuche das U.V.-Spektrum von Aneurin bei verschiedenem pH unter den gleichen Versuchsbedingungen untersucht. Im weiteren wurde bestimmt, ob die pH-Verschiebung im Bereich zwischen pH 3–6 reversibel ist oder nicht.

Das Aneurin wurde in Sörensen Phosphatpuffer gelöst. Die Konzentration von Aneurin betrug $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter. Das pH variierte zwischen 3 und 8.

Die Resultate dieser Versuche sind in Abb. 1 zusammengefaßt. Auf der Abszisse ist die Wellenlänge in m μ , auf der Ordinate die molekulare Extinktion aufgetragen. Die Schichtdicke betrug bei allen Versuchen 1 cm.

Wie aus der Abb. hervorgeht, ist das Spektrum von Aneurin zwischen pH 5–8 durch zwei Maxima charakterisiert. Eines der Maxima liegt bei Wellenlänge 232–234 m μ , das zweite bei 265–268 m μ (pH 6–8). Bei pH 5 ist das erste Maximum etwas in das Langwellige verschoben (239 m μ), während das zweite bei 263 m μ ist. Das Aneurinspektrum weist bei pH 4

² Erwähnenswert ist, daß auch in zwei zusammenfassenden Arbeiten von Loofbourow, 1943 (15) und Morton, 1942 (16) die Absorptionsspektren von Aneurin gut besprochen werden.

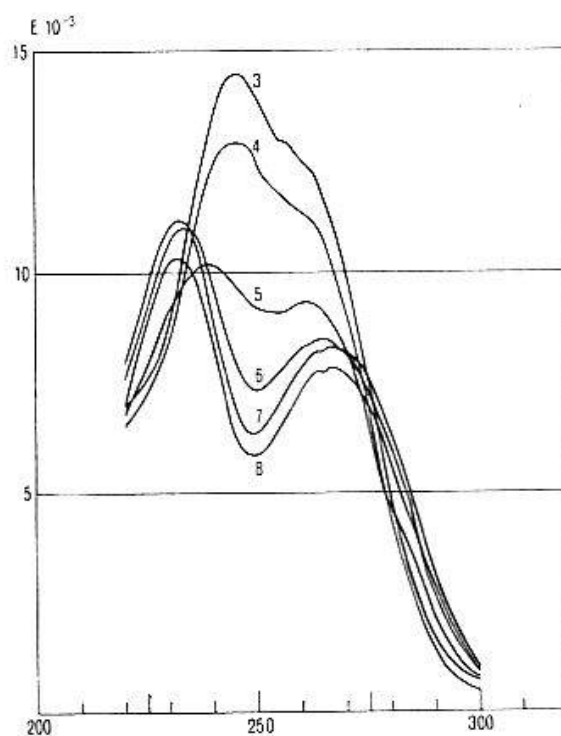


Abb. 1.

Abb. 1. Die pH-Abhängigkeit des U.V.-Absorptionsspektrums von Aneurin. Die Zahlen bei den Kurven geben das pH, bei welchem das Spektrum aufgenommen wurde, an.

und 3 nur noch einen Gipfel bei der Wellenlänge 246 $m\mu$ auf. In der Literatur (siehe unter anderen *Loofbourow* [15], Seite 128) ist wiederholt darauf hingewiesen worden, daß das Absorptionsspektrum von Aneurin in neutralem Bereich zwei und in saurem ein Maximum besitzt. Auch *Holiday* (l. c.) meint, daß erst unter pH 5,5 ein Maximum zu erwarten sei. Wie aber aus unseren Versuchen hervorgeht, ist dies nicht ganz richtig. Das Ultraviolettabsorptionsspektrum von Aneurin zeigt bei pH 6 und auch bei pH 5 zwei Maxima.

Diese durch die pH-Verschiebung verursachte Änderung des B_1 -Spektrums ist, wie das aus den nachfolgenden Versuchen ersichtlich ist, im Bereich zwischen pH 3–6 reversibel.

Wird z. B. eine B_1 -Lösung von pH 3,0 durch Zugabe von Phosphatpuffer auf pH 6 gebracht, so ändert sich das Spektrum entsprechend (Abb. 2). Fügt man dieser Aneurinlösung einige Tropfen HCl bei, bis pH 3 erreicht ist, so weist das Spektrum wieder nur ein Maximum auf. Nach Zurückpuffern auf pH 6 wird wieder das Absorptionsspektrum mit zwei Maxima beobachtet (Abb. 3).

Dieser Befund ist vom Standpunkt unserer weiteren Versuche sehr wichtig. Das U.V.-Spektrum von Aneurin weist nämlich – wie wir das nachfolgend sehen werden – bei Änderung des Moleküls z. B. bei der

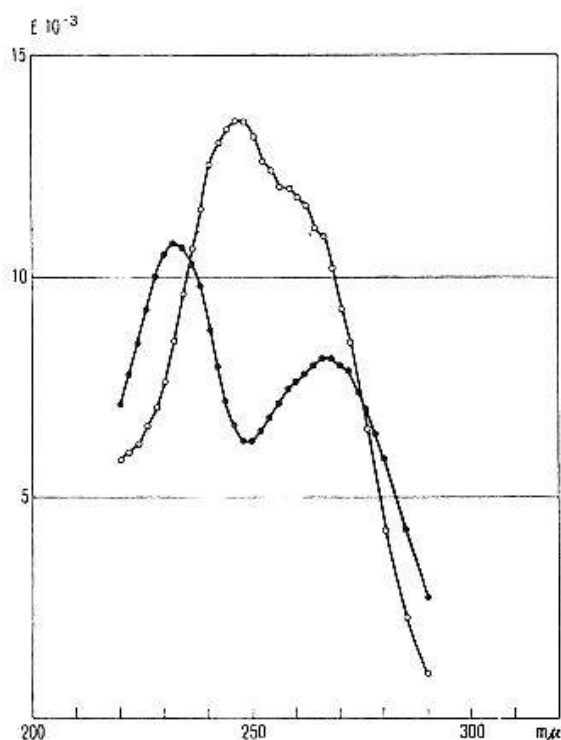


Abb. 2.

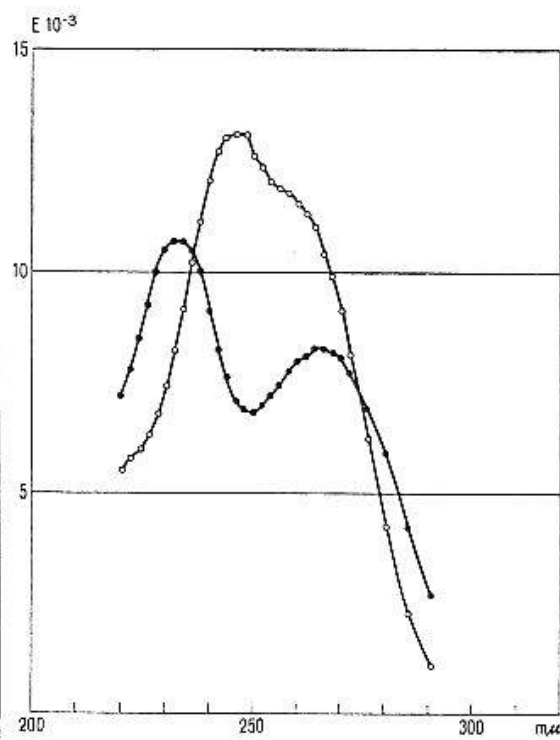


Abb. 3.

Abb. 2. Die Reversibilität des Absorptionsspektrums von Aneurin. Änderung des Spektrums bei Verschiebung des pH von 3 auf 6. $\circ-\circ-\circ$ = pH 3, $\bullet-\bullet-\bullet$ = pH 6.

Abb. 3. Die Reversibilität des Absorptionsspektrums von Aneurin. Erneute Verschiebung des pH von 6 auf 3 und anschließende Rückpufferung von pH 3 auf 6. $\circ-\circ-\circ$ = pH 3, $\bullet-\bullet-\bullet$ = pH 6.

Sulfitspaltung nur in einem bestimmten Bereich (pH 6–9) eine charakteristische Änderung auf.

Andererseits findet eine Spaltung von Aneurin durch Bisulfit nur in stark saurem Milieu statt.

2. U.V.-Absorptionsspektren von Aneurin, der Pyrimidin- und Thiazolkomponenten und ihrer Gemische («künstliche» B_1 -Spaltung).

Es schien uns im Hinblick auf die weiteren Versuche von Vorteil, wenn man erst die fortlaufende Aneurinspaltung durch einfache Modellversuche nachahmt. Das Aneurin wurde daher mit seiner Thiazol- (4-Methyl-5-(β -oxyäthyl)-thiazol) und Pyrimidinkomponente (2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidindihydrochlorid) in verschiedenen Proportionen gemischt, wobei folgende Lösungen hergestellt wurden:

1. Aneurinlösung (enthaltend $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter)
2. $\frac{3}{4}$ T. Aneurinlösung (1) und $\frac{1}{4}$ T. Thiazol-Pyrimidin-Gemisch (5)
3. $\frac{1}{2}$ T. Aneurinlösung und $\frac{1}{2}$ T. Thiazol-Pyrimidin-Gemisch
4. $\frac{1}{4}$ T. Aneurinlösung und $\frac{3}{4}$ T. Thiazol-Pyrimidin-Gemisch.
5. Thiazol-Pyrimidin-Gemisch (Lösung, enthaltend je $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter der Thiazol- und der Pyrimidinkomponente).

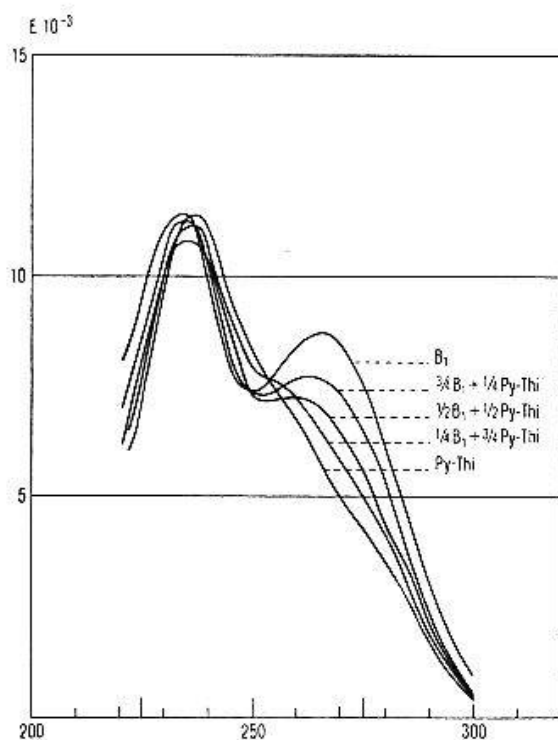


Abb. 4.

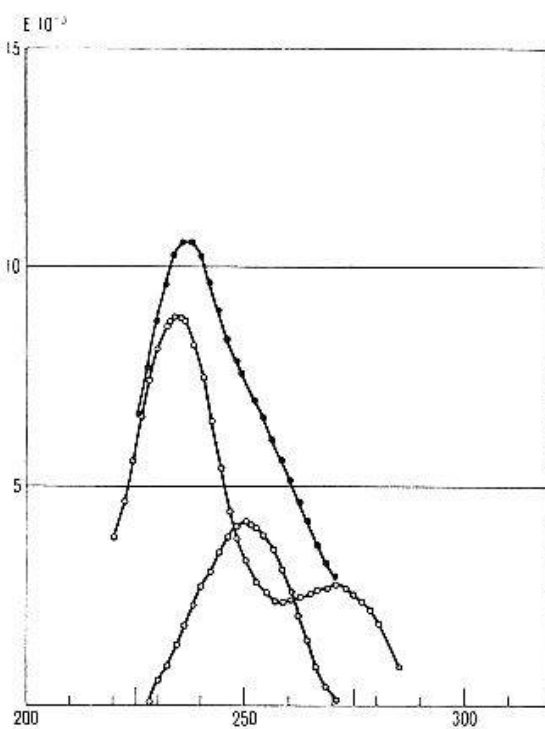


Abb. 5.

Abb. 4. U.V.-Absorptionsspektren von Aneurin, der Pyrimidin- und Thiazolkomponenten und ihrer Gemische («künstliche» B_1 -Spaltung)

Abb. 5. Von den Thiazol- und Pyrimidinkomponenten berechnetes Spektrum. $\circ-\circ-\circ$ mit 2 Maxima = Pyrimidinanteil, $\circ-\circ-\circ$ mit 1 Maximum = Thiazolkomponente. $\bullet-\bullet-\bullet$ = Summe des Thiazol- und Pyrimidinspektrums.

Die Versuche wurden bei pH 6.0 durchgeführt.

Das Resultat dieser Versuche kann aus Abb. 4 entnommen werden.

Das Aneurin zeigt wie üblich zwei Maxima bei 234 und 265 $m\mu$. Beim kurzwelligen Maximum ist nur eine sehr geringe Änderung zu beobachten. Es verschiebt sich nämlich etwas in den langwelligen Bereich, und zwar desto mehr, je mehr Pyrimidin-Thiazol im Versuchsgemisch vorhanden ist.

Das Maximum bei 265 $m\mu$ weist dagegen eine sehr charakteristische Änderung auf. Je weniger Aneurin und je mehr Thiazol-Pyrimidin im Gemisch vorhanden ist, desto niedriger wird dieses Maximum. Das Spektrum von einem Thiazol-Pyrimidin-Gemisch allein hat kein zweites Maximum, sondern ergibt eine gerade absteigende Linie. Dies entspricht praktisch dem Spektrum – wie das Abb. 5 gut zeigt – welches von den Spektren der Thiazol- und Pyrimidinkomponente berechnet wurde.

3. Die Spaltung von Aneurin mittelst Na-pyrosulfit und die Änderung des U.V.-Absorptionsspektrums. Quantitative Bestimmung der B_1 -Konzentration auf Grund der Absorptionsänderung bei 250 $m\mu$.

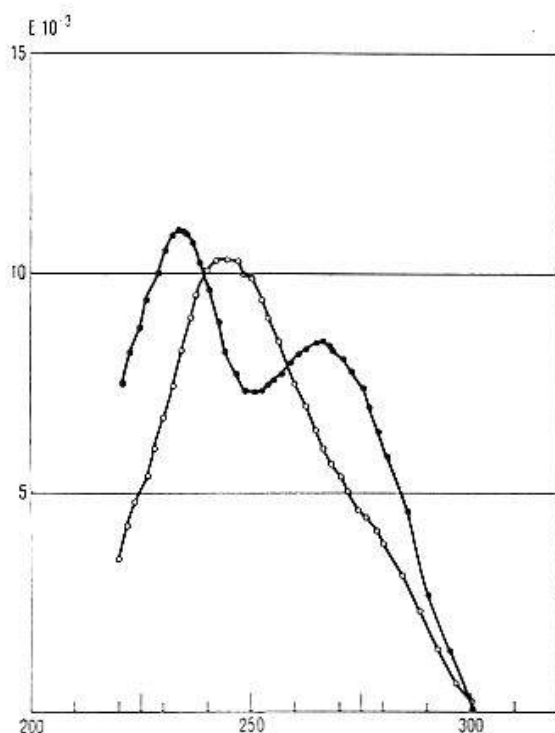


Abb. 6.

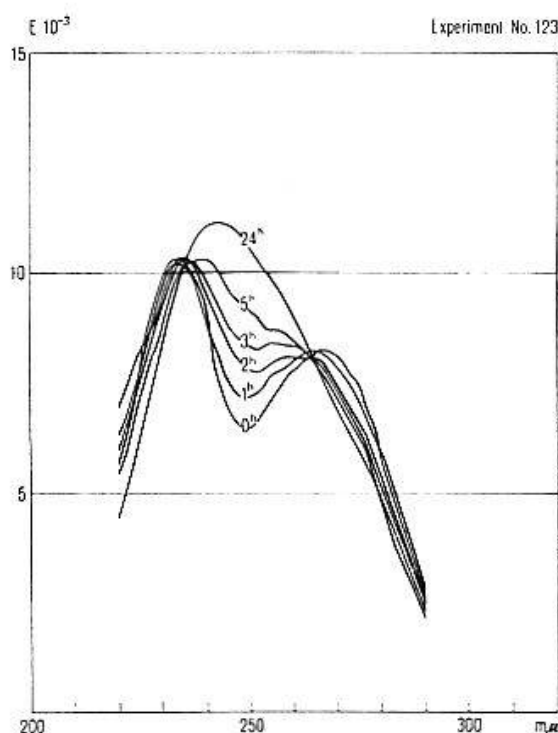


Abb. 7.

Abb. 6. Die Spaltung von Aneurin mittelst Na-pyrosulfit und die Änderung des U.V.-Absorptionsspektrums. —•—•— U.V.-Absorptionsspektrum von Aneurin, ○—○—○ = Spektrum der Spaltprodukte.

Abb. 7. Zeitlicher Verlauf der Änderungen des U.V.-Absorptionsspektrums während der Sulfitspaltung.

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, wie das Spektrum von Aneurin sich ändert, falls man das Molekül bei der Methylenbrücke mit Sulfit spaltet, wie das von *Williams, Waterman, Keresztesy* und *Buchman* 1935 (17) beschrieben worden ist.

Da das von *Williams* und Mitarb. gebrauchte Natriumbisulfit Verunreinigungen enthält, welche die spektrophotometrische Bestimmung stören, wurde bei diesen Experimenten Natriumpyrosulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) verwendet. Die ersten Versuche wurden mit den gleichen Vitamin- B_1 - und Sulfitkonzentrationen wie bei *Williams* durchgeführt.

Von einer 12,4%igen Natriumpyrosulfitlösung (Natriumpyrosulfit puriss. pro anal.) werden $18,8 \text{ cm}^3$ entnommen und dann 1,2 g Vitamin B_1 eingewogen und gelöst. Der pH-Wert dieser Lösung beträgt 3,8. Das Versuchsgemisch wird nun auf dem Wasserbad auf 100°C erwärmt. Nach 5 Minuten beginnen weiße Kristalle (Pyrimidinsulfonsäure) auszufallen. Nach 90 Minuten ist die Reaktion beendet. Nun wird das ganze Reaktionsgemisch (Kristalle und Lösung) in 350 cm^3 Sörensen-Puffer (pH 8) gelöst und mit destilliertem Wasser auf 800 cm^3 gebracht. Von dieser Lösung wird 1 cm^3 entnommen und mit dest. H_2O auf 100 cm^3 ver-

dünnt, wobei das pH auf 6.0 eingestellt wird. Diese Lösung gelangt zur spektrophotometrischen Messung. Das Spektrum von Aneurin wird vor und nach Sulfitspaltung bestimmt. Das Resultat dieser Versuche zeigt Abb. 6.

Wie daraus ersichtlich, ändert sich das Spektrum von Aneurin während des Versuches; die zwei Maxima verschwinden und nach 90 Minuten Versuchsdauer ergibt sich ein Spektrum mit einem einzigen Maximum bei $246\text{ m}\mu$. Das so beobachtete Absorptionsspektrum entspricht prinzipiell demjenigen einer Pyrimidin-Thiazol-Gemisch-Lösung (siehe Abb. 4 und 5), jedoch ist das Maximum noch mehr in den langwelligen Bereich verschoben worden.

Dieser Versuch zeigt deutlich, daß es möglich ist, die Sulfitspaltung von Aneurin durch U.V.-Spektra zu verfolgen.

In den folgenden Experimenten haben wir versucht, die durch Natriumpyrosulfit verursachte Spaltung von Aneurin fortlaufend zu verfolgen. Die Versuchsanordnung wurde etwas geändert. Die Konzentration von Aneurin im Versuchsgemisch haben wir auf $5\gamma/1\text{ cm}^3$, d. h. auf die Menge reduziert, mit welcher unsere früheren Versuche mit Karpfeneingeweideextrakt durchgeführt wurden (Somogyi, 1949 [18], 1952 [1]). Natriumpyrosulfit war im Überschuß in der Lösung, 40 cm^3 des Versuchsgemisches enthielten demnach: $2\text{ cm}^3\text{ B}_1$ -Stammlösung ($= 200\gamma\text{ B}_1$), 8 cm^3 Phosphatpuffer (pH 6), 25 cm^3 Natriumpyrosulfit ($1,6\text{ mg}/1\text{ cm}^3$) und 5 cm^3 Aqua bidest.

Ein typischer Versuch aus einer Reihe von 10 Versuchen ist in Abb. 7 dargestellt. Das Spektrum von Aneurin wurde sofort bei Beginn des Versuches und nach 1, 2, 3, 5 und 24 Stunden aufgenommen. Parallel wurden die B_1 -Konzentrationen nach der Thiochrommethode bestimmt.

Das U.V.-Spektrum von Aneurin weist im Laufe der Sulfitspaltung charakteristische Änderungen auf. Je mehr Aneurin durch Pyrosulfit gespalten wurde, desto mehr Licht wird bei der Wellenlänge von $250\text{ m}\mu$ absorbiert. Diese Absorptionsänderung – wie dies aus den nachfolgenden Ausführungen hervorgeht – kann für eine quantitative Berechnung der B_1 -Konzentration im Versuchsgemisch verwendet werden.

Gleichzeitig mit der eben geschilderten Änderung bei $250\text{ m}\mu$ zeigt das Maximum bei $264\text{ m}\mu$ einen geringen Rückgang der Absorption. Das Maximum bei $235\text{ m}\mu$ verschiebt sich etwas in den langwelligen Bereich. Der letzterwähnte Vorgang weist eine Ähnlichkeit mit demjenigen auf, welchen wir bei der «künstlichen» Aneurinspaltung bei der gleichen Wellenlänge ($235\text{ m}\mu$) beobachteten (siehe Abb. 4). Dagegen bestehen im Verhalten des Spektrums bei $250\text{ m}\mu$ und $266\text{ m}\mu$ zwischen der Sulfit- und der «künstlichen» Spaltung wesentliche Unterschiede. Das U.V.-Spektrum

des gespaltenen Aneurins ist wiederum demjenigen sehr ähnlich – wie auch schon beim vorhergehenden Versuch erwähnt – welches in der Lösung des Thiazol-Pyrimidin-Gemisches bestimmt wurde.

In der nächsten Tabelle sind die Vitamin-B₁-Konzentrationen eines Versuches verglichen, wobei diese Werte einerseits auf Grund der molekularen Extinktion bei 250 m μ berechnet, anderseits mittels der Thiochrommethode bestimmt wurden.

Tabelle 1

Zeit in Std.	Aneurin in %		Diffe- renz in %
	Thiochrom	Spektro- photometer	
0	100	100	
1	90	93	+ 3
2	75	83	+ 8
3	65	69	+ 4
5	50	40	– 10
24	5	0	– 5

Die Unterschiede sind annehmbar, insbesondere wenn man in Betracht zieht, daß der durch die Thiochrommethode bestimmte Aneurinwert die aktuelle B₁-Konzentration der Versuchslösung zu einem bestimmten Zeitpunkt ergibt, daß sich dagegen die Aufnahme der U.V.-Absorptionskurve über längere Zeit (ca. 20 Minuten) erstreckt. Diese zeitliche Verschiebung kann an und für sich schon zu den erwähnten Differenzen führen.

In Abb. 8 haben wir die Resultate dieser Versuche zusammengefaßt. Auf der Abszisse ist das gespaltenen Aneurin in % aufgetragen, falls die B₁-Bestimmungen mit der Thiochrommethode durchgeführt worden sind.

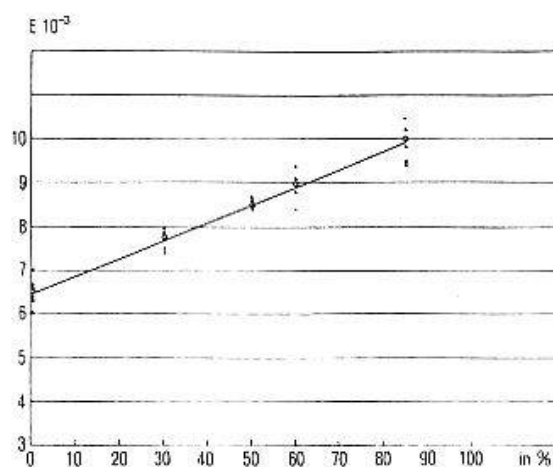


Abb. 8. Vergleich der spektrophotometrischen Bestimmungsweise von Aneurin mit der Thiochrommethode. E = gefundene Extinktion bei 250 m μ . % = inaktiviertes Aneurin.

Auf der Ordinate ist die molekulare Extinktion von Vitamin B₁ bei 250 m μ angegeben. Die Punkte stellen Einzelbestimmungen und die Kreise Mittelwerte dar. Diese graphische Darstellung der Versuche zeigt schön, daß unter den erwähnten Versuchsbedingungen eine gute Übereinstimmung der durch die zwei Methoden festgestellten Aneurinwerte besteht, und somit eine Absorptionsänderung des Aneurinspektrums bei 250 m μ im pH-Bereich zwischen 3 und 6 für eine quantitative Berechnung der B₁-Konzentration der Versuchslösung ausgewertet werden kann.

4. Die Zerstörung von Aneurin in alkalischen Lösungen.

Während das Vitamin B₁ in stark sauren Lösungen sehr stabil ist, wird es in alkalischem Milieu – wie allgemein bekannt – schon bei Temperaturen von z. B. 37° C leicht zerstört (siehe unter anderen *Farrer*, 1941 [19], *Beadle* und Mitarb., 1943 [20]). Bei diesem Abbau kann es sich entweder um eine Oxydation oder um eine Umwandlung der Ammoniumform des Aneurins in die Thiolform (siehe Diskussion) handeln. Bei diesen Vorgängen geht die Inaktivierung von Aneurin auf eine ganz andere Weise vor sich als bei der Sulfitspaltung. Es schien uns daher von Interesse, die Frage zu untersuchen, wie die B₁-Konzentration (bestimmt mit der Thiochrommethode) und das U.V.-Spektrum von Aneurin sich im Laufe der Zeit ändern, falls die Versuchslösung eine alkalische Reaktion (pH 9) aufweist.

Wir haben daher eine Versuchslösung enthaltend 5 γ bzw. 15 γ /l cm³ mit einem pH von 9 bei 37° C 144–216 Stunden stehen lassen und die Konzentration an Vitamin B₁ bzw. das U.V.-Spektrum in Abständen von 24 Stunden bestimmt. Die Zusammensetzung der ersten Versuchslösung war die folgende: 4 cm³ Vitamin-B₁-Stammlösung (= 400 γ B₁), 20 cm³ Phosphatpuffer (pH 9) und 56 cm³ Aqua bidest. Eine Kontrolllösung ohne Aneurin wurde ebenfalls hergestellt. Beide wurden in Erlenmeyerkolben (mit Glaszapfen) in einem Brutschrank bei 37° C aufbewahrt. Die Versuche wurden der Kontrolle halber auf zweierlei Weise durchgeführt; diejenigen, welche 5 γ B₁/l cm³ Testlösung enthalten haben, wurden bei pH 9 gehalten, und auch das U.V.-Spektrum wurde bei diesem pH bestimmt (Typ I, 100 γ B₁/20 cm³ Testlösung). Bei anderen Versuchen (Typ II) war die Aneurinkonzentration höher (300 γ B₁ 20 cm³). Das pH der Versuchslösung war ebenfalls 9, jedoch haben wir in der Probe, die zur Aufnahme des Absorptionsspektrums verwendet wurde, das pH auf 8 eingestellt.

Den Grund dieser kleinen Variation der Versuchsanordnung werden wir später noch erklären. Wie aus den nachfolgenden Ausführungen zu entnehmen ist, führten beide Versuchstypen zum gleichen Resultat.

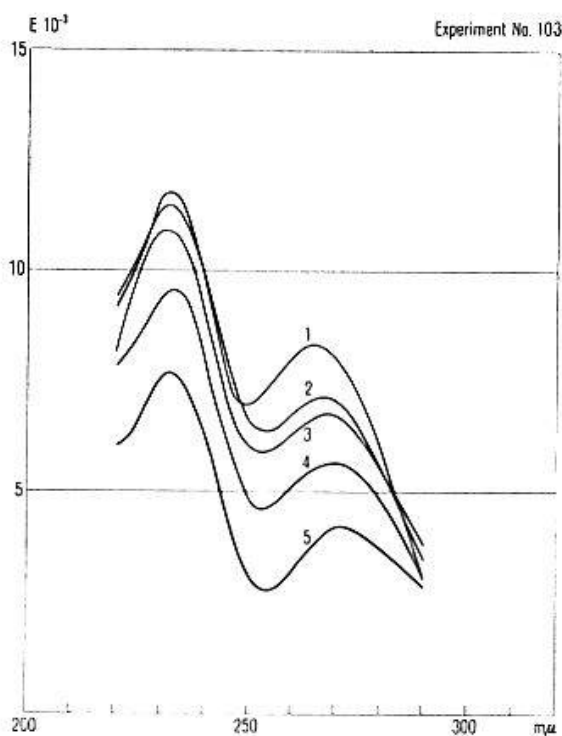


Abb. 9.

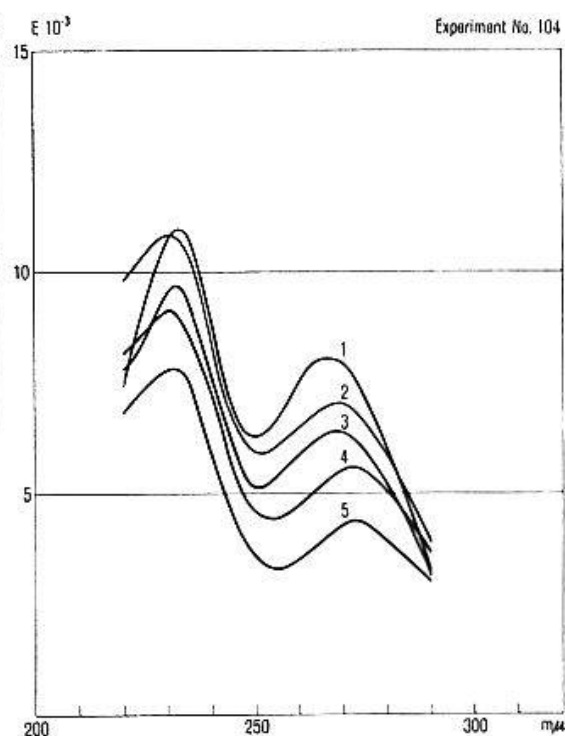


Abb. 10.

Abb. 9. Die Zerstörung des Aneurins in alkalischer Lösung (pH 9). Die Änderungen der Vitamin-B₁-Konzentration ($\gamma/20 \text{ cm}^3$) in der Versuchslösung im Lauf des Versuches: 1. Beginn: 97 γ , 2. 24 Std.: 55 γ , 3. 48 Std.: 35 γ , 4. 72 Std.: 25 γ , 5. 144 Std.: 8 γ . Die Spektren wurden bei pH 9 aufgenommen.

Abb. 10. Die Zerstörung des Aneurins in alkalischer Lösung (pH 9) Vitamin-B₁-Konzentrationen in der Versuchslösung ($\gamma/20 \text{ cm}^3$). 1. Beginn: 290 γ , 2. 24 Std.: 180 γ , 3. 48 Std.: 130 γ , 4. 72 Std.: 40 γ , 5. 144 Std.: 8 γ . Die Spektren sind bei pH 8 aufgenommen (siehe Text).

Ein typisches Experiment aus einer Reihe von 8 Versuchen ist in Abb. 9 dargestellt. Auf der Abszisse sind wieder die Wellenlängen in $m\mu$, auf der Ordinate die molekulare Extinktion aufgetragen. Das Versuchsgemisch enthielt 100 γ B₁/20 cm^3 Testlösung und der Versuch wurde gemäß Typ I durchgeführt. Die Aneurinbestimmungen (Thiochrom) und die Aufnahmen des U.V.-Spektrums erfolgten in Abständen von 24 Stunden (ausnahmsweise 48 Stunden). Die Gesamtdauer des Versuches betrug in diesem Fall 144 Stunden.

Der Aneuringehalt der Testlösung nimmt innert 144 Stunden bei 37° C von 97 γ auf 8 γ ab. Im U.V.-Absorptionsspektrum des Aneurins konnten folgende Änderungen im Laufe des Versuches beobachtet werden: Parallel mit der Abnahme der B₁-Konzentration in der Versuchslösung geht eine Verminderung der molekularen Extinktion und eine Verschiebung des Absorptionsmaximums bei 265 $m\mu$ gegen den langwelligen Bereich. Die Verringerung der molekularen Extinktion bezieht sich auf das ganze Spektrum und kann z. B. bei 265 $m\mu$ (in bestimmtem Bereich nicht

unter 20 γ) quantitativ ausgewertet werden, ähnlich wie wir das beim B_1 -Abbau durch Sulfite beschrieben haben. Die Genauigkeit ist jedoch geringer als bei der Sulfitspaltung. Zwischen Abnahme der B_1 -Konzentration nach der Thiochrommethode und dem Rückgang der molekularen Extinktion besteht demnach eine weitgehende Parallelität. Gleichzeitig mit der Verminderung der molekularen Extinktion verschiebt sich das zweite Maximum graduell von 265 $m\mu$ auf 273 $m\mu$.

Es wurde angenommen, daß eventuell eine größere Genauigkeit zwischen den Aneurinwerten, bestimmt nach der Thiochrommethode und der Abnahme der molekularen Extinktion zu finden ist, falls man höhere Vitamin- B_1 -Konzentrationen (300 γ /20 cm^3 Versuchsgemisch) verwendet und das Spektrum durch Pufferung bei pH 8 aufnimmt.

Der Ablauf eines solchen Versuches (Typ II) ist in Abb. 10 zusammengefaßt.

Wie daraus ersichtlich ist, gelangten wir auch mit dieser Versuchsanordnung zu den gleichen Resultaten wie beim vorher erwähnten Typ. Der Abbau von B_1 geht schneller vor sich, was auf das größere Konzentrationsgefälle zurückzuführen ist. Die Verschiebung des zweiten Maximums von 267 $m\mu$ auf 274 $m\mu$ und die Abnahme der molekularen Extinktion verläuft gleich wie bei den Versuchen mit einer Aneurinkonzentration von 100 γ B_1 /20 cm^3 . Die Parallelität zwischen Abnahme der B_1 -Konzentration und derjenigen der molekularen Extinktion ist auch hier ausgeprägt, die Genauigkeit ist jedoch nicht größer als beim vorhergehenden Versuchstyp.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß man durch die Änderung der U.V.-Spektra unter bestimmten Bedingungen auf die Art des B_1 -Abbaues schließen kann. Der chemische Weg des Abbaues von Aneurin ist bei der Sulfitspaltung ganz ein anderer als bei der alkalischen Zerstörung, und so sind die Änderungen der U.V.-Spektra auch verschieden (siehe Diskussion).

5. Die Inaktivierung von Aneurin durch Karpfeneingeweideextrakt (KEE) und die Änderung der U.V.-Absorptionsspektren.

Es ist bekannt, daß KEE das Aneurin auch im In-vitro-Versuch abbaut (Krampitz und Woolley, 1944 [21], Sealock, 1943 [22] siehe Literatur bei Somogyi [1]). Diese Inaktivierung von Aneurin durch KEE geht sehr rasch vor sich, wie das aus den Arbeiten von Somogyi, 1949 (23) hervorgeht. Wir haben daher untersucht, ob auf die Einwirkung von KEE Änderungen auch in den U.V.-Absorptionsspektren von B_1 eintreten und wenn ja, welche.

Zu den Versuchen wurde ein durch Dialyse und $(NH_4)_2SO_4$ -Fällung

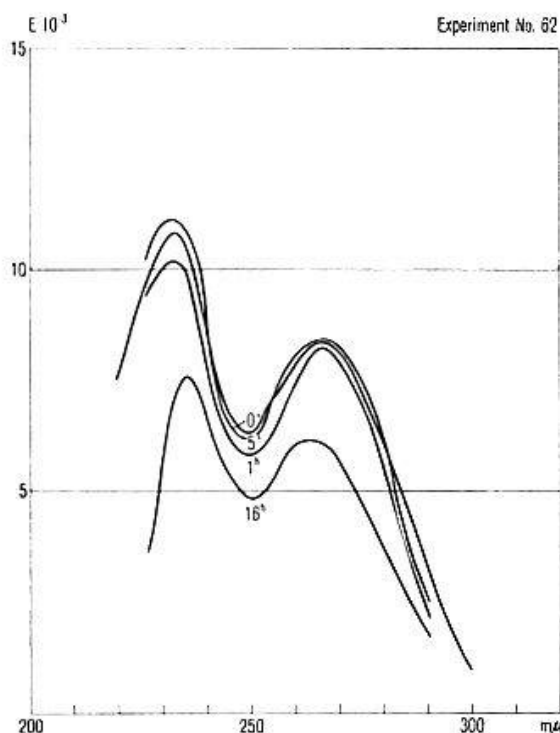


Abb. 11.

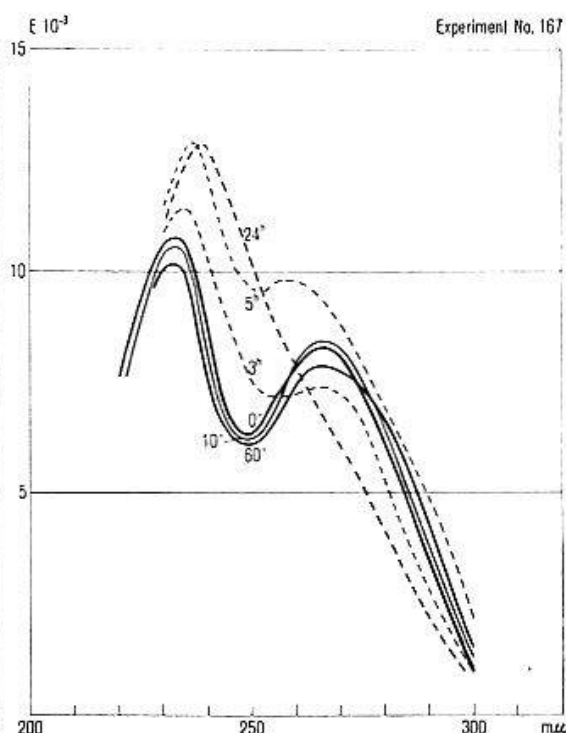


Abb. 12.

Abb. 11. Die Wirkung von KEE auf das U.V.-Absorptionsspektrum von Aneurin. Ablauf des Versuches und die Vitamin-B₁-Konzentrationen in 20 cm³ Versuchslösung: 0 Min.: 100 γ, 1 Min.: Zugabe von 0,5 cm³ KEE, 5 Min.: 10 γ, 1 Std.: 8 γ, 16 Std.: 5 γ.

Abb. 12. Die kombinierte Wirkung von KEE und Natriumpyrosulfit auf das Absorptionsspektrum von Aneurin. Ausgezogene Linien = vor und nach KEE-Zugabe. Gestrichelte Linien = nach zusätzlicher Natriumpyrosulfitzugabe. Ablauf des Versuches und die Vitamin-B₁-Konzentrationen/20 cm³ Versuchslösung: 0 Min.: 100 γ B₁, 1 Min.: Zugabe von 0,5 cm³ KEE, 10 Min.: 14 γ B₁, 60 Min.: 12 γ B₁. Nach dieser B₁-Bestimmung Sulfitzugabe. 3 Std. nachher: 10 γ B₁, 5 Std. nachher: 8 γ B₁, 24 Std.: kein B₁ nachweisbar.

(75%) gereinigter Karpfeneingeweideextrakt (KEE) verwendet. Die Zusammensetzung der Testlösung per 20 cm³ war die folgende: 1 cm³ Aneurinstammlösung (= 100 γ B₁), 0,5 cm³ gereinigter KEE, 2 cm³ Phosphatpuffer (pH 6) und 16,5 cm³ Aqua bidest. Das Versuchsgemisch hatte ein pH von 6, die Temperatur betrug 20 und 37° C. Bestimmt wurden in der Testlösung die B₁-Konzentrationen (Thiochrom) nach 5 Minuten, 1 Stunde und 16–24 Stunden Versuchsdauer, und gleichzeitig wurden die U.V.-Spektren aufgenommen.

Nach 5 Minuten Versuchsdauer (1. Messung) sind 90% des vorgelegten Aneurins inaktiviert, das Spektrum zeigt aber praktisch keine Änderung (siehe Abb. 11).

Nach 1 Stunde Versuchsdauer weist die molekulare Extinktion eine sehr geringe Verminderung auf; der Charakter des U.V.-Spektrums ist aber der gleiche wie bei der ersten Messung. Die B₁-Konzentration be-

trägt jetzt 8 γ (Anfangswert 100 γ), d. h. praktisch gleich wie 5 Minuten nach der KEE-Zugabe. Nach 16 Stunden zeigt sich in den meisten Fällen (manchmal nicht so ausgeprägt wie bei dem in Abb. 11 dargestellten Versuch) eine bedeutende Abnahme der Lichtabsorption und auch beide Maxima zeigen eine geringe Verschiebung. Eine Weiterführung der Versuche über 16–24 Stunden ist wegen der Trübung der Testlösung nicht möglich und auch nicht notwendig. Die Versuche ergeben im Prinzip ebenso bei 20° wie auch bei 37° das gleiche Resultat.

Bemerkenswert ist, daß das U.V.-Absorptionsspektrum praktisch unverändert blieb, auch wenn gemäß Bestimmung mit der Thiochrommethode nur noch ein geringer Bruchteil (10%) der ursprünglichen Vitamin-B₁-Konzentration in der Versuchslösung vorhanden war. Ähnliche Beobachtungen haben aber schon *Ogston* und *Peters* 1936 (24) gemacht. Sie berichten, daß sie eine Aneurinlösung der Wirkung der Wasserstoffelektrode auf gleiche Weise, wie bei potentiometrischer Titration 12 Stunden lang bei pH 7 ausgesetzt haben. Trotzdem die Lösung gemäß Katatorulintest 80% ihrer Vitamin-B₁-Aktivität eingebüßt hatte, wies das Absorptionsspektrum keine Änderung auf.

Wir selber erklären unsere Versuche so, daß der KEE das Aneurinmolekül auf andere Weise angreift, als das die Sulfite tun. Die Summe der Reaktionsprodukte ergibt das gleiche Absorptionsspektrum wie das Aneurin (siehe weiteres in der Diskussion). Diese Annahme steht auch damit nicht in Widerspruch, daß das Spektrum nach 16 Stunden eine weitere Änderung erfährt, da wir aus der Arbeit von *Krampitz* und *Woolley*, 1944 (21) wissen, daß die Inaktivierung von Aneurin durch KEE zweistufig vor sich geht. Erst entsteht eine Verbindung, die mikrobiologisch getestet keine B₁-Aktivität mehr besitzt. Diese wandelt sich dann weiter um, wobei 2-Methyl-4-amino-5-oxymethylpyrimidin isoliert werden konnte. Die zweite Änderung des Spektrums könnte die Folge dieser eben erwähnten Umwandlung sein. In ähnliche Richtung weisen auch die Versuche von *Barnhurst* und *Hennessy*, 1952 (25).

6. Die kombinierte Wirkung von Karpfeneingeweideextrakt und Natriumpyrosulfit auf das Absorptionsspektrum von Aneurin.

Es schien uns von Bedeutung, den experimentellen Beweis für unsere Annahme zu erbringen, daß das Absorptionsspektrum, das nach Einwirkung von KEE zu beobachten ist, nicht mehr von Aneurin verursacht wird. Wir haben darum der Versuchslösung genau wie bei der vorhergehenden Versuchsreihe KEE zugegeben und 1 Stunde lang einwirken lassen. Nachher wurde Na-pyrosulfit in gleicher Konzentration wie bei den Sulfitversuchen dem Versuchsgemisch zugefügt und die An-

derungen im U.V.-Spektrum sowie in der B_1 -Konzentration laufend registriert.

Folgende Überlegungen wurden gemacht: Ist die Verbindung, die nach KEE-Einwirkung ein dem B_1 entsprechendes Spektrum gibt, tatsächlich Aneurin, so muß auf nachfolgende Natriumpyrosulfitzugabe das Spektrum die gleichen Änderungen zeigen, wie das im Teil 3 dieser Arbeit beschrieben wurde. Handelt es sich aber um eine andere bzw. andere Verbindungen als Aneurin, dann sollte sich das Spektrum nach Natriumpyrosulfitzugabe anders ändern.

Ein typischer Versuch aus einer Reihe von 10 Experimenten ist in Abb. 12 dargestellt. Die ausgezogenen Linien sind die Spektren von Aneurin vor sowie 10 Minuten und 60 Minuten nach Zugabe des gereinigten KEE. Wie daraus zu entnehmen ist – gleich wie bei der vorherigen Versuchsreihe – ändern sich die B_1 -Spektren nach KEE-Zugabe in dieser Zeitspanne praktisch nicht (eine Tendenz zur Abnahme der Lichtabsorption ist nach 1 Stunde festzustellen), wobei nach 10 Minuten Versuchsdauer gemäß Thiochrombestimmung schon 86% des vorgelegenen Aneurins inaktiviert waren. Nach 60 Minuten war der Vitamin- B_1 -Wert (88% inaktiviert) praktisch der gleiche.

Nun setzten wir der nämlichen Versuchslösung Natriumpyrosulfit zu und haben nach 1, 3, 5 und 24 Stunden die Vitamin- B_1 -Konzentration bestimmt und gleichzeitig die U.V.-Spektren (gestrichelte Linien) aufgenommen. Die B_1 -Werte zeigten nach Pyrosulfitzugabe – wie zu erwarten war – nur noch eine geringe weitere Abnahme, da doch in der Versuchslösung gemäß Thiochrombestimmung sehr wenig B_1 vorhanden war. Wie aus Abb. 12 gut hervorgeht, sind die Änderungen der U.V.-Spektren ganz anders als diejenigen, die man beim Aneurinspektrum nach Zugabe von Pyrosulfit beobachtete (vergleiche Abb. 7). Das kurzwellige Maximum verschiebt sich bei diesem Versuch (Abb. 12) praktisch während der ganzen Versuchsdauer nicht, dagegen weist dasselbe von Aneurin auf Sulfitzugabe allein nach 5 und 24 Stunden eine ganz wesentliche Verschiebung in das Langwellige auf (Abb. 7). Bei der kombinierten Wirkung von *KEE* und *Sulfiten* wird bei der Wellenlänge 232 m μ eine wesentliche Zunahme der Lichtabsorption schon nach 3 Stunden Versuchsdauer festgestellt, die sich im Laufe des Versuches (5- und 24-Stunden-Werte) so stark vergrößern kann, daß das Maximum von einem Anfangswert von $E = 10\,800$ auf 13 000 gelangt (Abb. 12). Dagegen wird bei der Aneurinspaltung durch *Sulfite* allein bei der nämlichen Wellenlänge erst nach 24 Stunden Versuchsdauer eine bescheidene Zunahme der Lichtabsorption beobachtet.

Auch in den Änderungen des langwelligen Maximums sowie des ge-

samen Spektrums bestehen wesentliche Unterschiede zwischen den zwei Versuchsreihen, die beim Vergleich der Abb. 7 und 12 sofort auffallen. So verschiebt sich bei der kombinierten Wirkung von KEE und Sulfid das Maximum bei 267 m μ in den kurzwelligen Bereich, und es ist im Gegensatz zu den Versuchen, die wir im Teil 3 dieser Arbeit besprochen haben, auch nach 3 und 5 Stunden Versuchsdauer gut erkennbar.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das U.V.-Absorptionsspektrum auf Sulfitzugabe in der Tat andere Änderungen zeigt, falls man der Versuchslösung vorhergehend KEE zugefügt hat, als wenn nur Pyrosulfit auf das Aneurin wirkt.

Auf Grund des Unterschiedes im Verhalten der U.V.-Absorptionsspektren bei den zwei Versuchsreihen (Abb. 7 und 12) darf man wohl die Folgerung ziehen, daß auf die Einwirkung von KEE das Aneurin erst in eine andere Verbindung oder Verbindungen umgewandelt wird.

Diskussion

Unsere Versuche, die sich mit dem U.V.-Absorptionsspektrum des Aneurins bei verschiedenen pH befassen, bedürfen keines besonderen Kommentares. Es hat sich gezeigt, daß die Nachprüfung dieser Frage der Mühe wert war, da durch diese Versuche eine in Lehr- und Handbüchern oft vorkommende, nicht ganz präzise Angabe über den Zusammenhang zwischen pH und Charakter des U.V.-Spektrums von B₁ (neutrales und alkalisches pH: zwei Maxima; saurer Bereich: 1 Maximum) richtiggestellt werden konnte. Die weiteren Versuche zeigten, daß die durch pH-Verschiebung verursachte Änderung des U.V.-Spektrums zwischen pH 3 und 6 vollständig reversibel ist. Kontrollversuche, die wir auf Anregung von Professor *Peters*, Oxford³ bei pH 6–9 durchführten zeigen, daß auch in diesem Bereich eine Reversibilität des Spektrums vorhanden ist, wenn auch in geringerem Maßstabe als zwischen pH 3 und 6. Eine Verschiebung im Spektrum bei den Maxima (Abnahme der Extinktion) konnte beobachtet werden, falls man die Versuchslösung bei pH 9 ca. 20–60 Minuten stehen ließ und nachher bis pH 6 zurückpufferte. Diese Änderung des Spektrums ist auf die Labilität des Aneurins in alkalischen Lösungen zurückzuführen. Vom Standpunkt unserer Versuche (Sulfitspaltung) hat die Frage der Reversibilität zwischen pH 6 und 9 keine Bedeutung.

Wie aus den weiteren Versuchen hervorgeht, sind die Änderungen des U.V.-Spektrums verschieden und hängen davon ab, auf welche Weise das Aneurin inaktiviert wurde. Bei der Sulfitspaltung ist die Zunahme

³ Herrn Professor *Peters* möchten wir für die anregende Diskussion auch an dieser Stelle danken.

der Lichtabsorption bei der Wellenlänge $250\text{ m}\mu$ charakteristisch. Zwischen dieser Zunahme und den Thiochromwerten besteht ein quantitativer Zusammenhang. – Bei Zerstörung des Aneurins in alkalischem Milieu ist die Abnahme der Lichtabsorption des Gesamtspektrums, insbesondere bei der Wellenlänge $265\text{ m}\mu$, am auffallendsten, welche Abnahme in bestimmtem Bereich ebenfalls quantitativ auszuwerten ist. Im Falle der Inaktivierung von Aneurin durch KEE ändert sich das U.V.-Spektrum vorerst (5-Minuten- und 1-Stunden-Wert) praktisch nicht, wobei gemäß Thiochrombestimmung bereits rund 90% des Aneurins inaktiviert waren. Durch die weiteren Versuche, in welchen man KEE und Pyrosulfit nacheinander auf das Aneurin einwirken ließ, wurde der indirekte Beweis erbracht, daß das Spektrum, welches nach Zugabe von KEE aufgenommen worden ist, nicht von Aneurin stammt. Auf Grund dessen darf man den Schluß ziehen, daß das KEE das Aneurin anders inaktiviert, als dies durch Sulfite verursacht wird.

Interessant ist noch zu erwähnen, daß die U.V.-Spektra von Aneurin und Thiazol-Pyrimidin-Gemischen («künstliche» Aneurinspaltung) von denjenigen des Aneurins bei fortlaufender Sulfitspaltung differieren, was eigentlich nicht zu erwarten war und ein schöner Beweis für die Empfindlichkeit der spektrophotometrischen Methode ist.

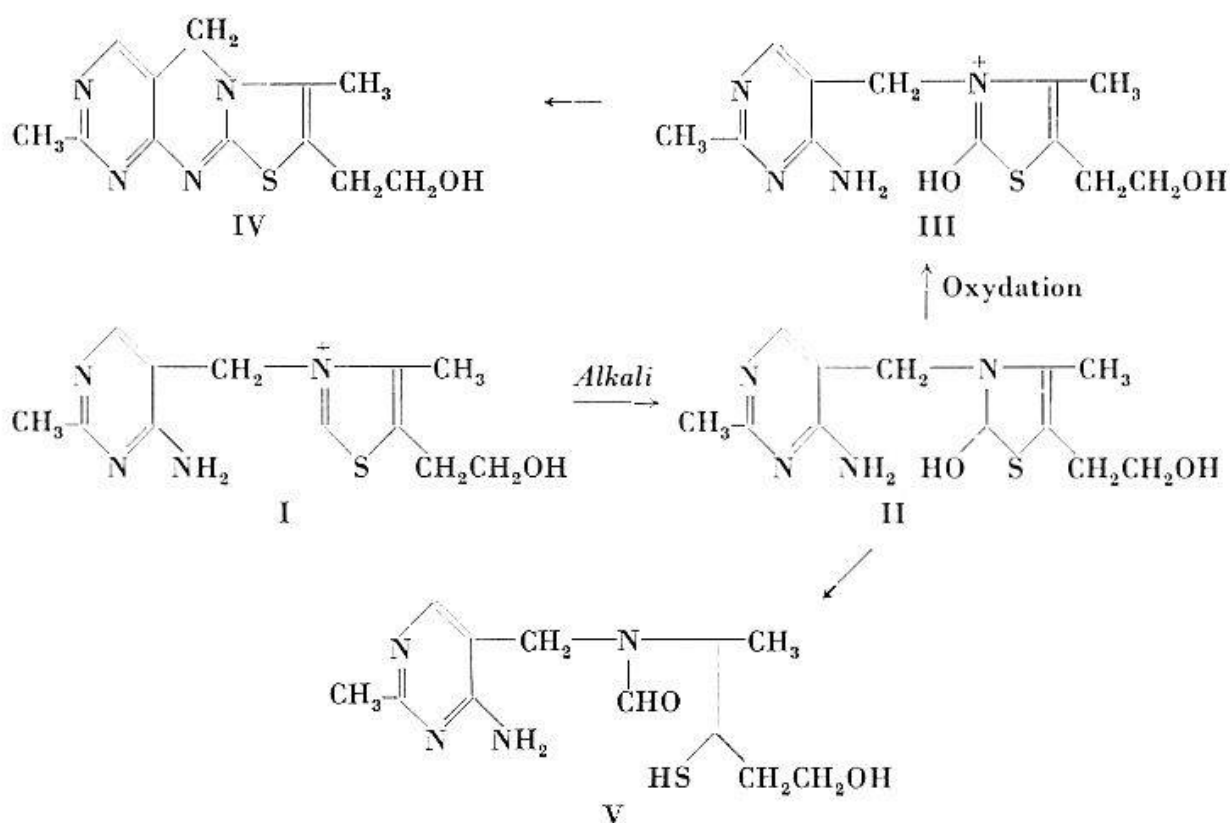
Aus diesen Versuchen geht gleichzeitig hervor, daß eine allgemeine, in jedem Fall anwendbare spektrophotometrische Vitamin-B₁-Bestimmung nicht möglich ist, da die Änderung der U.V.-Spektra von der Art des Vitamin-B₁-Abbaues abhängt. Dagegen läßt sich von Fall zu Fall (Sulfitspaltung, alkalische Zerstörung des Aneurins) ein quantitativer Zusammenhang zwischen Thiochromwert und Änderung der U.V.-Spektra der Versuchslösung feststellen.

Zum Schluß möchten wir noch kurz die Zerstörung des Aneurins in alkalischer Lösung besprechen. Genaue Literaturangaben darüber, welche chemische Änderungen vor sich gehen, falls Aneurin in dest. Wasser gelöst und z. B. bei pH 9 und 37° C gehalten wird, findet man nahezu keine.

Die eine Möglichkeit ist, daß das Aneurin ähnlich oxydiert wird, wie es bei Zimmertemperatur durch Zugabe von Oxydationsmitteln, z. B. K₃Fe(CN)₆ oder KMnO₄ in alkalischem Milieu geschieht. In diesem Fall würde der Vorgang der folgende sein (s. S. 462):

Aneurin (I) geht durch Alkalieinwirkung in das Carbinol (II) über, das zu III oxydiert wird, wobei die Frage offen bleibt, ob nachher der Ringschluß zum Thiochrom (IV) erfolgt oder nicht.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Änderung der Absorptionsspektren wäre, daß man nach *Williams*, 1938 (26), vergleiche auch *Matsukawa* und *Yurugi*, 1953 (27) in alkalischer Lösung einen Übergang des



Aneurins von der Ammoniumform (I) über das Carbinol (II) in die Thiolform (V) annimmt, welche letztere bei der Oxydation kein Thiochrom mehr ergeben kann.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es durch die vorliegenden spektrophotometrischen Untersuchungen gelungen ist, eine Methode zu finden, mit deren Hilfe man auf die Art des Abbaues von Aneurin schließen kann.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektren die Änderungen des Aneurinmoleküls unter verschiedenen Versuchsbedingungen verfolgt und parallel die B_1 -Konzentrationen in den Versuchslösungen mit der Thiochrommethode bestimmt. Da das U.V.-Spektrum des Aneurins pH-abhängig ist, und die diesbezüglichen Literaturangaben einander widersprechen, wurden die pH-Abhängigkeit und die Reversibilität des Vitamin- B_1 -Spektrums einer neuen Prüfung unterzogen.

Die Versuche ergaben folgende Resultate:

1. Das U.V.-Absorptionsspektrum des Aneurins wurde im *pH-Bereich von 3–8* untersucht. Zwischen 5 und 8 ist das Spektrum durch zwei Maxima bei Wellenlängen von 232–234 $m\mu$ (pH 5: 239 $m\mu$) bzw. 265–68 $m\mu$ charakterisiert. Bei pH 3 und 4 weist es nur einen Gipfel bei 246 $m\mu$ auf.

Die durch die *pH-Verschiebung* verursachte Änderung des Vitamin-B₁-Spektrums ist zwischen pH 3 und 6 *reversibel*.

2. Das Aneurin wurde mit der Thiazol- (4-Methyl-5[- β -oxyäthyl]-thiazol) und Pyrimidinkomponente (2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidindihydrochlorid) in verschiedenen, *äquimolekularen Proportionen gemischt* und auf diese Weise eine Aneurinspaltung nachgeahmt («künstliche» Aneurinspaltung). Während beim kurzwelligen Maximum nur eine unbedeutende Verschiebung auftrat, weist das Maximum bei 265 m μ eine charakteristische Änderung auf. Je *weniger* Aneurin und je *mehr* Thiazol-Pyrimidin-Anteil im Gemisch vorhanden sind, desto *niedriger* wird dieses Maximum.

3. Falls man das Aneurin mit Natriumpyrosulfit spaltet (gleiche Sulfitkonzentration wie die von Williams verwendete), so verschwinden die beiden Maxima des Aneurins und nach einer Versuchsdauer von 90 Minuten bei 100° C ergibt sich ein Spektrum mit einem Maximum bei 246 m μ . Dieses letztere Absorptionsspektrum entspricht prinzipiell demjenigen einer Pyrimidin-Thiazol-Lösung.

In weiteren Versuchen wurde die durch Natriumpyrosulfit verursachte Spaltung von Aneurin fortlaufend verfolgt. Je mehr Aneurin durch Pyrosulfit gespalten wird, desto mehr Licht wird bei der Wellenlänge von 250 m μ absorbiert. Diese Absorptionsänderung kann für eine quantitative Berechnung der B₁-Konzentration in der Versuchslösung verwendet werden. Es werden die Unterschiede in der Änderung der B₁-Spektra zwischen «künstlicher» und Sulfitsspaltung erörtert.

4. Aneurinlösungen wurden bei pH 9 bis 168–216 Stunden bei 37° C stehengelassen und die B₁-Konzentration sowie das U.V.-Spektrum in Abständen von 24 Stunden bestimmt. Bei dieser alkalischen Zerstörung des Aneurins geht parallel mit der Abnahme der B₁-Konzentration eine Verminderung der molekularen Extinktion sowie eine Verschiebung des Absorptionsmaximums bei 265 m μ gegen den langwelligen Bereich hin. Die Verringerung der molekularen Extinktion bezieht sich auf das ganze Spektrum und kann bei 265 m μ im bestimmten Bereich quantitativ ausgewertet werden.

5. Es wurde die Wirkung eines gereinigten Karpfeneingeweideextraktes (KEE) auf das U.V.-Absorptionsspektrum und auf die Konzentration des Aneurins in der Testlösung verfolgt. Während nach 5 Minuten Versuchsdauer 90% des vorgelegenen Aneurins inaktiviert sind (Thiochrombestimmung), weist das Spektrum praktisch keine Änderung auf. Nach 16 bis 20 Stunden Versuchsdauer zeigt sich in den meisten Fällen eine bedeutende Abnahme der Lichtabsorption und auch die beiden Maxima weisen

eine geringe Verschiebung auf. Diese Resultate werden mit ähnlichen Befunden anderer Autoren verglichen und es wird eine Erklärung dieser Ergebnisse gegeben.

6. Bei den weiteren Versuchen wurde nach einer *vorhergehenden KEE-Einwirkung der Versuchslösung Na-Pyrosulfit* zugefügt. Die Änderung des U.V.-Spektrums im Laufe eines 24stündigen Versuches ist wesentlich anders, als bei der durch Sulfit allein verursachten Aneurinspaltung. Diese Versuche scheinen den Beweis zu erbringen, daß der gereinigte Karpfeneingeweideextrakt das Aneurin in eine andere Verbindung oder in Verbindungen überführt, die zwar ein Vitamin-B₁-ähnliches Spektrum aufweisen, jedoch keine biologische Wirkung besitzen und auch nicht in Thiochrom überführt werden können.

Die Resultate dieser Versuche und ihre Bedeutung werden zum Schluß diskutiert.

Résumé

L'auteur étudie à l'aide des spectres d'absorption dans l'ultraviolet des modifications de la molécule d'aneurine dans diverses conditions expérimentales. La concentration en B₁ des solutions étudiées est mesurée par la méthode au thiochrome. Les données de la littérature concernant l'influence du pH sur le spectre d'absorption de l'aneurine étant contradictoires, l'auteur a d'abord étudié cette action du pH et la réversibilité du spectre de la vitamine B₁.

Les résultats sont les suivants:

1. Le spectre d'absorption a été étudié pour des *pH allant de 3 à 8*. Entre 5 et 8, le spectre est caractérisé par deux maxima dans les longueurs d'onde de 232 à 234 m μ (pH 5: 239 m μ) et 265–268 m μ avec un pH de 3 et de 4, il ne montre qu'un maximum à 246 m μ .

Les modifications spectrales de la vitamine B₁ dues à des *variations du pH entre 3 et 6 sont réversibles*. L'auteur insiste sur l'importance de ce fait dans le développement ultérieur des recherches.

2. *L'aneurine a été ensuite mélangée aux composants thiazoliques (4-méthyl-5-(β -oxyéthyl)-thiazole) et pyrimidiniques (2-méthyl-4-amino-5-aminométhyl-pyrimidine-dihydrochloride) dans diverses proportions équimoléculaires, afin de simuler par ce procédé une scission de la molécule (scission «artificielle» de l'aneurine)*. Tandis que dans le maximum des ondes courtes, le déplacement de la bande d'absorption n'est qu'insignifiante, le maximum à 265 m μ révèle une modification caractéristique. Moins il y a d'aneurine et plus il y a de thiazolepyrimidine dans le mélange, plus ce maximum est bas.

3. Si l'on scinde la molécule d'aneurine par le pyrosulfite de sodium

(dans les mêmes concentrations de sulfite que l'indique *Williams*), les deux maxima de l'aneurine disparaissent, et, après une durée de 90 minutes à 100° C, on obtient un maximum dans les bandes de 246 $m\mu$. Ce dernier spectre d'absorption correspond en principe à celui d'une solution de Pyrimidinethiazole.

Dans une autre série d'expériences, on a étudié les différents stades de la scission de l'aneurine par le pyrosulfite de sodium. Avec le taux d'augmentation de la quantité d'aneurine scindée par le pyrosulfite, augmente aussi l'absorption de lumière dans les bandes de 250 $m\mu$. Ces modifications de l'absorption peuvent être utilisées pour la détermination quantitative de la concentration de la vitamine B₁ dans la solution étudiée. Puis, l'auteur discute des différences que l'on trouve dans les modifications des spectres de B₁ scindée «artificiellement» et par le sulfite.

4. *Des solutions d'aneurine* ont ensuite été maintenues à un pH de 9 durant 168–216 heures, à une température de 37° C, et la teneur de vitamine B₁ ainsi que le spectre d'absorption u.v. déterminés toutes les 24 heures. Au cours de cette destruction alcaline de l'aneurine, on observe parallèlement une diminution de la concentration de B₁, un recul de l'extinction moléculaire et un déplacement de l'absorption maximum de 265 $m\mu$ dans le sens des plus grandes longueurs d'ondes. L'abaissement de l'extinction moléculaire s'observe dans le spectre entier et peut servir, dans un certain degré, de mesure quantitative aux environs de 265 $m\mu$.

5. L'auteur étudie l'action d'un *extrait purifié d'intestins de carpe* sur une solution d'aneurine et sur son spectre d'absorption dans l'ultra-violet. Alors qu'en 5 minutes, 90% de l'aneurine en présence sont inactivés (détermination par le thiochrome), le spectre ne présente pas de modification notable. Toutefois, au bout de 16–20 heures d'expérience, on voit dans la plupart des cas une diminution importante de l'absorption et les deux maxima présentent un léger déplacement. Ces résultats sont comparés à ceux de divers auteurs et on en donne une explication.

6. Dans d'autres expériences, on a *ajouté du pyrosulfite de Na*, après avoir soumis la solution étudiée à l'action de l'*extrait purifié d'intestins de carpe*. Les modifications du spectre u.v. au cours de 24 heures sont nettement différentes de celles que l'on observe dans la scission de l'aneurine par le sulfite seul. Ces expériences semblent prouver que l'extrait purifié d'intestins de carpe transforme l'aneurine en une substance semblable, qui donne un spectre identique à celui de la vitamine B₁, mais qui n'a aucune action biologique et qui ne peut être transformée en thiochrome.

Discussion des résultats.

Riassunto

Con l'aiuto degli spettri di assorbimento ultravioletti si studiano nel presente lavoro le modificazioni della molecola dell'aneurina in diverse condizioni sperimentali. Parallelamente si determinarono le concentrazioni di vitamina B₁ nelle soluzioni d'esperimento mediante il metodo al tiocromo. Siccome lo spettro ultravioletto dell'aneurina dipende dal pH e discordi sono le asserzioni nella bibliografia a questo proposito, si riesaminarono i rapporti di dipendenza dello spettro della vitamina B₁ dal pH e la sua reversibilità.

Gli esperimenti diedero i risultati seguenti:

1. Lo spettro di assorbimento ultravioletto dell'aneurine fu esaminato a un *pH* da 3 a 8. Dal 5 all'8 lo spettro è caratterizzato da due massimi nelle lunghezze d'onda 232–234 m μ (pH 5: 239 m μ), risp. 265–268 m μ . A pH 3 e 4 mostra un solo vertice a 246 m μ .

Le modificazioni dello spettro della vitamina B₁ dovute al *cambiamento del pH* fra 3 e 6 sono *reversibili*. Si accenna all'importanza di questo reperto per le esperienze susseguenti.

2. Si mescolò l'aneurina con le componenti tiazolo (4-metile-5-(-ossietile)-tiazolo) e pirimidina (2-metile-4-amino-5-aminoetile-pirimidin-diidrocloreuro) in proporzioni equimolecolari differenti, così da imitare una dissociazione dell'aneurina. (Dissociazione «artificiale» dell'aneurina). Mentre nel massimo delle onde corte si riscontrò soltanto un leggero cambiamento senza importanza, il massimo a 265 m μ mostrò una modificazione caratteristica. Quanto *meno* aneurina e quanto *più* tiazolo-pirimidina sono contenuti nel miscuglio, tanto *più basso* diventa questo massimo.

3. Se si scinde l'aneurina con *pirosulfito di sodio* (concentrazioni uguali a quelle usate da *Williams*), i due massimi dell'aneurina scompaiono, e dopo una durata di 90 minuti a 100° C si ha uno spettro con un massimo a 246 m μ . Questo ultimo spettro di assorbimento corrisponde in principio a quello di una soluzione di pirimidina e tiazolo.

In ulteriori esperimenti si seguì di continuo la dissociazione dell'aneurina causata dal pirosulfito di sodio. Quanto più aneurina è dissociata dal pirosulfito, tanto più luce viene assorbita nella lunghezza d'onda di 250 m μ . Questa modificazione dell'assorbimento può servire a calcolare quantitativamente la concentrazione di vitamina B₁ nella soluzione in prova. Si discutono le differenze tra le modificazioni degli spettri della vitamina B₁ riscontrate nella dissociazione «artificiale» e quelle ottenute con il sulfito.

4. Si lasciarono *soluzioni di aneurina* a pH 9 durante 168–216 ore a una temperatura di 37° C e si determinarono tutte le 24 ore la concentrazione

di vitamina B₁ e lo spettro ultravioletto. Durante questa ossidazione alcalina dell'aneurina, parallelamente alla diminuzione della concentrazione di vitamina B₁ si producono una diminuzione dell'estinzione molecolare e uno spostamento del massimo di assorbimento a 265 m μ verso le onde lunghe. La riduzione dell'estinzione molecolare interessa tutto lo spettro e a 265 m μ può, in una certa zona, essere calcolata quantitativamente.

5. Si studiò l'effetto di un estratto purificato di intestini di carpine sullo spettro di assorbimento ultravioletto e sulla concentrazione di aneurina nella soluzione teste. Mentre 5 minuti dopo l'inizio dell'esperienza 90% dell'aneurina è inattivata (determinazione con il tiocromo), lo spettro praticamente non mostra alcun cambiamento. Dopo 16–20 ore di esperimento, nella maggior parte dei casi si vede una diminuzione importante dell'assorbimento di luce e anche i due massimi mostrano un piccolo spostamento. Si confrontano questi risultati con reperti analoghi di altri autori e si dà una spiegazione di questi fenomeni.

6. In altri esperimenti si aggiunse alla soluzione in prova *pirosulfito di sodio*, dopo aver fatto agire sulla stessa un estratto di intestini di carpine. La modificazione dello spettro ultravioletto durante un'esperienza di 24 ore è completamente diversa da quella riscontrata quando l'aneurina è dissociata soltanto con il solfito. Questi esperimenti sembrano dimostrare che l'estratto purificato di intestini di carpine trasforma l'aneurina in un altro composto, il quale ha uno spettro analogo alla vitamina B₁, ma non possiede effetti biologici e non può essere trasformato in tiocromo.

Si discutono infine i risultati di queste esperienze e la loro importanza.

Summary

In this paper the changes in the thiamine molecule under different experimental conditions were followed by means of the ultraviolet absorption spectra. At the same time the concentrations of B₁ in the test solutions were determined by the thiochrome method. Since the ultraviolet spectrum of thiamine depends upon the pH, and the published reports are conflicting, the pH dependance and the reversibility of the spectrum of vitamin B₁ were investigated again.

The experiments produced the following results:

1. The ultra-violet absorption spectrum of thiamine was investigated over a pH range of 3–8. Between 5 and 8 the spectrum is characterised by 2 maxima of wave lengths from 232–234 m μ (pH 5: 239 m μ) and of 265–268 m μ . At pH 3 and 4 there is only one at 246 m μ .

This change in the spectrum brought about by the alteration of pH

is reversible between pH 3 and 6. The significance of this finding for the further experiments is discussed.

2. Thiamine was mixed with the thiazole (4-methyl-5-[hydroxyethyl]-thiazole) and the pyrimidine components (2-methyl-4-amino-5-amino-methyl-pyrimidine dihydrochloride) in different equimolecular proportions, thus imitating the progressive cleavage of the thiamine molecule ("artificial" thiamine split). At the short wave maximum there is only an insignificant shift, but at the maximum 265 $m\mu$ there is a characteristic change. The less thiamine and the more thiazole-pyrimidine is present in the test mixture, the greater is the decrease in this maximum.

3. If the cleavage of thiamine is brought about by sodium pyrosulphite (same concentrations as used by *Williams*) the two maxima of thiamine disappear and after 90 minutes at 100° C there is a spectrum with one maximum at 246 $m\mu$. This absorption spectrum corresponds in principle to that of a pyrimidine-thiazole solution.

In the subsequent experiments the progressive splitting of thiamine by sodium pyrosulphite was followed. The more thiamine is split by pyrosulphite, the more light is absorbed at the wave length of 250 $m\mu$.

This change in absorption can be used for a quantitative estimation of the B₁ concentration in a test solution. The differences in the changes of spectra of the "artificial" and the sulphite cleavage are discussed.

4. Thiamine solutions were kept at pH 9 and 37° C for 168 to 216 hours. The concentration of B₁ as well as the ultra-violet spectrum of the test solution were estimated at intervals of 24 hours. At this alkaline destruction of thiamine a decrease in the molecular extinction and a bathochromic shift of the absorption maximum at 265 $m\mu$ goes simultaneously with the decrease of the B₁ concentration. The decrease in the molecular extinction occurs for the whole spectrum and at 265 $m\mu$ it can be used for quantitative calculation of the thiamine concentration in a certain range.

5. The effect of a purified extract of carp intestines on the concentration and on the u.v.-absorption spectrum of thiamine was followed. After 5 minutes 90% of the thiamine in the test solution is inactivated (thiochrome determination) but the spectrum shows practically no change. After 16–20 hours there is in most cases a certain decrease in light absorption and in both maxima there is a slight shift. These results are compared with those of other authors and an explanation is given for the observed phenomena.

6. In further experiments sodium pyrosulphite was added after a preliminary treatment with intestinal extract of carps. The changes in the u.v.-absorption spectrum of thiamine in the course of 24 hours differ

significantly from those which could be observed when thiamine was cleaved by sulphite alone. These experiments seem to prove that the purified extract of carp intestines changes thiamine into another compound (or compounds) which has a spectrum similar to vitamin B₁ but which has no biological activity and does not give the thiochrome reaction.

The results of these experiments and their significance are discussed in conclusion.

Ich danke Herrn Prof. A. von Muralt für die anregenden Diskussionen und für sein Interesse, welches er diesen Versuchen entgegengebracht hat, Herrn G. Bühner, dipl. Naturw. ETH und Herrn E. Ott für die große Arbeit, die sie bei der Durchführung dieser Versuche geleistet haben.

Der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften möchte ich auch an dieser Stelle für die gewährte Unterstützung meinen besten Dank aussprechen.

1. Somogyi, J. C.: Die Antianeurinfaktoren. Verlag Hans Huber, Bern 1952.
2. Fellenberg, T. von: Lebensmitt. u. Hyg. **33**, 3 (1942).
3. Fellenberg, T. von: Lebensmitt. u. Hyg. **33**, 67 (1942).
4. Brasch, A. von: unveröffentlicht (1948), beschrieben s. unter 1. Seite 13 (1952).
5. Windaus, A., Tschesche, R., Ruhkopf, H., Laquer, F., und Schultz, F.: Z. Physiol. Chem. **204**, 123 (1932).
6. Peters, R. A., und Philpot, J. S. L.: Proc. roy. Soc. (Ser. B) **113**, 48 (1933).
7. Holiday, E. R.: Biochem. J. **29**, 718 (1935).
8. Heyroth, F. F., und Loofbourow, J. R.: Nature (Lond.) **134**, 461 (1934); J. Amer. chem. Soc. **56**, 2010 (1934); Biochem. J. **30**, 651 (1936).
9. Wintersteiner, O., Williams, R. R., und Ruehle, A. E.: J. Amer. chem. Soc. **57**, 517 (1935).
10. Melnick, J. L.: J. biol. Chem. **131**, 615 (1939).
11. Ferrari, C.: Chim. e Ind. (Milano) **24**, 161 (1942).
12. Stämpfli, R.: Über den photochemischen Zerfall von Vitamin B₁, Thiochrom und Thiazol, Diss., Bern 1942.
13. Holiday, E. R., Irwin, J. O., und Mitarb.: Quart. J. Pharm. Pharmacol. **19**, 155 (1946).
14. Lenormant, H., und Lozé, C. de: C. R. Soc. Biol. (Paris) **232**, 1426 (1951).
15. Loofbourow, J. R.: Vitam. and Horm. **1**, 109 (1943).
16. Morton, R. A.: Absorption spectra of vitamins and hormones. Adam Hilger, London 1942.
17. Williams, R. R., Waterman, R. E., Keresztesy, J. C., und Buchman, E. R.: J. Amer. chem. Soc. **57**, 536 (1935).
18. Somogyi, J. C.: Helv. physiol. pharmacol. Acta **7**, C 24 (1949).
19. Farrer, K. T. II.: J. Proc. Austr. Chem. Inst. **8**, 113 (1941), zit. nach Robinson, F. A.: The Vitamin B Complex, New York 1951; Biochem. J. **39**, 128 (1945).
20. Beadle, B. W., Greenwood, D. A., und Kraybill, H. R.: J. biol. Chem. **149**, 339, 349 (1943).
21. Krampitz, L. O., und Woolley, D. W.: J. biol. Chem. **152**, 9 (1944).
22. Sealock, R. R., Livermore, A. H., und Evans, C. A.: J. Amer. chem. Soc. **65**, 935 (1943).
23. Somogyi, J. C.: Int. Z. Vitaminforsch. **21**, 341 (1949).
24. Ogston, A. G., und Peters, R. A.: Biochem. J. **30**, 736 (1936).
25. Barnhurst, J. A., und Hennessy, D. J.: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 353, 356 (1952).
26. Williams, R. R., und Spies, T. P.: Vitamin B₁ 163, New York 1938.
27. Matsukawa, T., und Yurugi, S.: Science **118**, 109 (1953).